

小児アレルギー疾患の遺伝的背景に関する研究

第I編 HLA による双生児例の検討

東京慈恵会医科大学小児科学教室

赤澤 晃

東邦大学医学部第二小児科学教室

小屋二六

国立小児医療研究センターアレルギー免疫研究部

飯倉洋治

小児アレルギー疾患発症の遺伝要因を調べるため双生児法により22家系の家系分析を行なった。卵性診断は Essen-Möller の式により、赤血球血液型8種類と HLA について一致した場合の一卵性双生児である確率を計算し一卵性双生児 (MZ) 8組と二卵性双生児 (DZ) 14組を対象とした。その結果アレルギー疾患全体の一致率は MZ が88%, DZ が86%, 喘息はそれぞれ75%, 73%, DF 特異 IgE 抗体陽性率はそれぞれ60%, 58%の一致率であったが, HLA haplotype の全く一致していない DZ では0%であった。血清総 IgE 抗体の双生児内の相関係数は MZ が0.593, DZ が0.063であり, MZ では高い相関を示した。以上の結果から抗体産生には遺伝要因の強い関与が無視できないといえた。

Key words: allergic disease — asthma — HLA — inheritance — twins

はじめに

疾患の発症に遺伝要因と環境要因がどのように影響しているのか分析する方法に双生児法がある¹⁾²⁾。すなわち1個の受精卵に由来する一卵性双生児と2個の受精卵に由来し、普通の兄弟と遺伝的に同等な二卵性双生児を比較することによって疾患発症にかかわる遺伝要因と環境要因を推定することができる。今回我々は小児アレルギー疾患を有する双生児22家系において家系調査を行い、アレルギー疾患の一致率、HLA haplotype と IgE 抗体について検討したので報告する。

対象と方法

患者は国立小児病院アレルギー科外来通院中の喘

息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎のいずれかを有する双生児例22家系を対象とした。問診、診察および採血は双生児、両親と同胞について行い、血液型、HLA haplotype の決定、血清 IgE 抗体の測定を全員についておこなった。双生児の年齢は2歳から16歳までであり、双生児の卵性診断は Bayes の原理から導かれた Essen-Möller の式により、ある遺伝形式について一致した場合の一卵性双生児である確率を計算した³⁾⁴⁾。つまりある集団での同性双生児の MZ と DZ の比を $q:1$ として、 $M_1 \cdot D_1$ は MZ と DZ がそれぞれの遺伝形質について一致する確率を示すとすると、MZ である確率は

$$\text{Pr (MZ)} = \frac{1}{1 + 1/q \cdot D_1/M_1}$$

として表すことができ、さらに n 個の遺伝形質についてでの MZ である確率は

$$\text{Pr (MZ)} = \frac{1}{1 + 1/q \cdot \prod (D_i/M_i)}$$

として表すことができる。今回遺伝形質として ABO 式血液型、MNSs 式血液型、Lewis 式血液型、Duffy 式血液型、Kidd 式血液型、Kell 式血液型、P 式血液型、Rhesus 式血液型および HLA haplotype を双生児と両親、その他同胞について調べた。日本人集団におけ

Received: October 29, 1990

Accepted: February 18, 1991

Abbreviations: DF *Dermatophagoides farinae*; DP *Dermatophagoides pteronyssinus*; DZ dizygotic twin; HLA human leukocyte antigen; MZ monozygotic twin; RAST radioallergosorbent test

る q の値は井上らの調査より 3.51 を用いた⁶⁾。その結果から $Pr(MZ)$ の値が 0.990 以上を一卵性双生児と判定した。

アレルギー疾患の診断は次のようにおこなった。喘息は臨床症状より呼吸性喘鳴を伴う呼吸困難発作を繰り返し起こすもの、アトピー性皮膚炎は皮疹の形態は様々であるが、掻痒を伴う湿潤性あるいは乾燥性の苔癬化局面を有するものとした。アレルギー性鼻炎はくしゃみ、水様性鼻汁、鼻閉を主徴とし、下鼻甲介粘膜の蒼白化と浮腫、腫脹のあるものとした。アレルギー性結膜炎は掻痒感と流涙を繰り返すものとした。

この方法によって MZ が 8 組と DZ が 14 組が対象となり、有するアレルギー疾患は Table 1 に示すごとくであった。

HLA のタイピングには 10ml のヘパリン加静脈血に同量の phosphate buffered saline (PBS) を加え 2 倍希釈し、比重 1017 の Percoll に重層して比重遠心分離法でリンパ球を採取した。得られたリンパ球を PBS にて洗浄し、5% heat inactivated fetal calf serum (HIFCS) 加 MaCoy's 5a medium に浮遊し、ナイロン・カラム法により T リンパ球、B リンパ球に分離した。さらにそれぞれをモノクローナル抗体である T/B Lympho-kwik, B Lympho-kwik (One-Lambda 社製) を使用して T リンパ球、B リンパ球の純度を高めた。それぞれ細胞数が $1.5 \sim 2 \times 10^6$ 個/ml になるように調製し、microcytotoxicity assay により HLA タイピングを行った。

HLA クラス I 抗血清は、Terasaki HLA-ABC Oriental tray Lot #4, #5, Oriental (72) well tray Lot #2, #4, #6, #6A を使用し、A 座抗原 9 種、B 座抗原 18 種、C 座抗原 4 種について測定した。HLA クラス II 抗原は、Terasaki HLA-DRW tray Lot #22, #23, #24, #27, #28 を使用し、DR 抗原 9 種、DQW 抗原 2 種、DRW 抗原 2 種についてそれぞれ duplicate または triplicate で測定した。

血清 IgE 抗体の測定は採血後冷却血清分離を行い測定まで -40°C で保存した。血清総 IgE 抗体は RIST 法で測定し、D.F., D.P. 抗原特異 IgE 抗体は RAST 法にて測定した。

結 果

1) 血清総 IgE 抗体, DF, DP 特異 IgE 抗体 (RAST

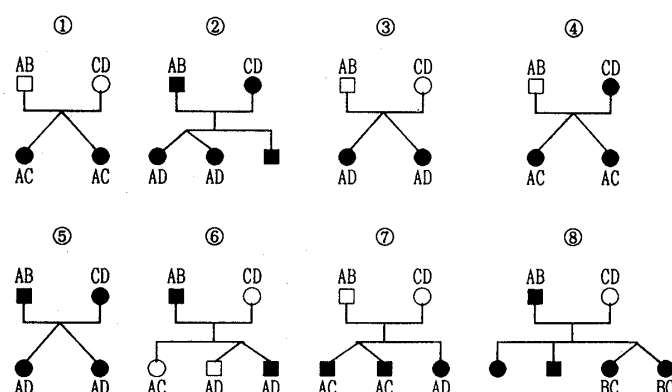


Fig. 1. Eight nuclear families of monozygotic twins with allergic disease. ○ : female, □ : male, ● ■ : with allergic disease, ○ □ : without allergic disease.

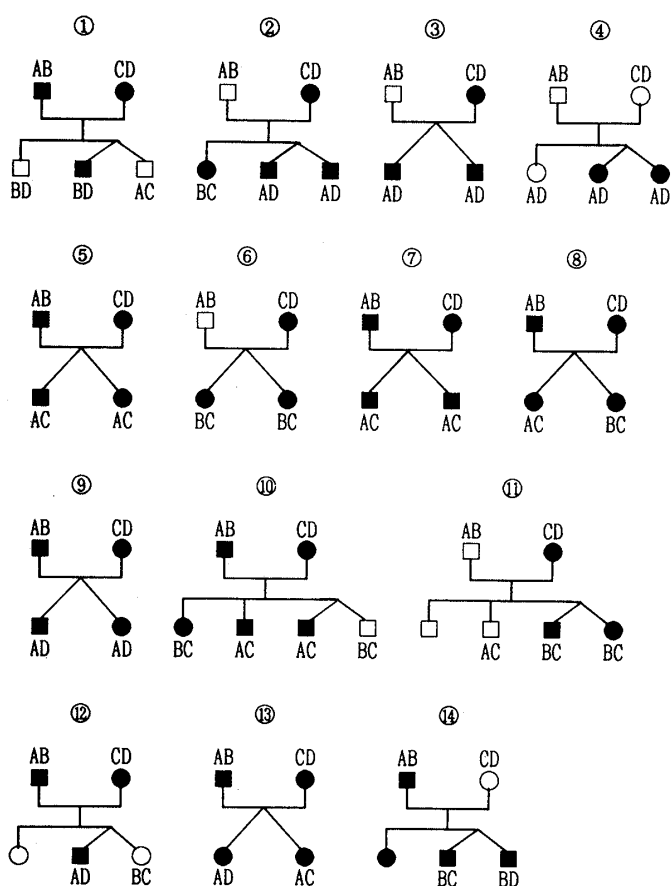


Fig. 2. Fourteen nuclear families of dizygotic twins with allergic disease. ○ : female, □ : male, ● ■ : with allergic disease, ○ □ : without allergic disease.

score) および HLA haplotype : 対象双生児の結果は Table 1 のごとくで、MZ の家系図を Fig. 1 に示し、DZ の家系図を Fig. 2 に示した。

アレルギー疾患と IgE 抗体の一致率を比較するに

あたって、DZ では HLA haplotype が一致しているかないいかでも検討を行った。

2) アレルギー疾患の一致率：喘息，アレルギー性鼻炎，アトピー性皮膚炎，アレルギー性結膜炎を含むア

レルギー疾患全体での一致率は MZ で 8 組中 7 組 (88%)，DZ では 14 組中 12 組 (86%) であり，DZ のなかでは HLA haplotype が一致している方が疾患の一致率も高かった (Table 2)．喘息は MZ が 4 組中 3 組

Table 1 HLA haplotype, serum IgE levels and specific IgE of twins

Twins	Age (year)	Sex	Allergic disease	IgE RIST (IU/ml)	IgE RAST		HLA haplotype					
					DP	DF	A	B	C	DR	DR	DQ
MZ ₁	4	F	AD	9.6	0	0	24	35			52	3
	4	F	AD	16.0	0	0	26	46	3	2		1
							24	35			52	3
							26	46	3	2		1
MZ ₂	5	F	AS・AD	334.2	4	4	24	51		2		1
	5	F	AS・AD	423.1	4	4	31	53	3			3
							24	51		2		1
							31	53	3			3
MZ ₃	15	F	AS・AR	669.2	4	4	24	39		2		1
	15	F	AS・AD	912.9	4	4	24		1	4	53	
							24	39		2		1
							24		1	4	53	
MZ ₄	5	F	AD	31.0	0	0	24	60		5	52	3
	5	F	AD	49.7	0	0	26	62		4	53	3
							24	60		5	52	3
							26	62		4	53	3
MZ ₅	4	F	AS	955.7	0	4	31	60		4	53	3
	4	F	AS	603.0	4	4	33	40		6	52	1
							31	60		4	53	3
							33	40		6	52	1
MZ ₆	6	M	NA	23.6	0	0	24	60	3	9	53	3
	6	M	AD	677.2	4	4	3	44	5	4		1
							24	60	3	9	53	3
							3	44	5	4		1
MZ ₇	14	M	AR	784.5	2	1	24	7	7	1		1
	14	M	AR	114.0	1	0	24	52		2		
							24	7	7	1		1
							24	52		2		
MZ ₈	10	F	AS・AC	142.0	3	4	26	46	3	9	53	
	10	F	AD	34.1	0	0	11	62	1	12		3
							26	46	3	9	53	
							11	62	1	12		3
DZ ₁	5	M	AD	1088.2	4	4	24	61		2		3
	5	M	NA	14.4	0	0	24			1		3
							33	44		2		1
							24	46		1		3
DZ ₂	9	M	AC	155.5	3	3				9	53	3
	9	M	AS	3749.2	4	4				1	52	1
										9	53	3
										1	52	1
DZ ₃	2	M	AD・AS	64.2	3	3	2	61		2		1
	2	M	AD・AS	310.0	4	4	33	44		6	52	
							2	61		2		1
							33	44		6	52	
DZ ₄	4	F	AS	536.2	4	4	26	61		2		1
	4	F	AS	545.4	4	4	24	52		2		1
							26	61		2		1
							24	52		2		1

D Z 5	5	M	AS	129.1	3	3	2	60	7	4	53	
	5	F	AS	4.8	0	0	24 2 24	7 60 7	7	9 4 9	53 53 53	
D Z 6	3	F	AS	65.1	0	0	33	58		3	52	3
	3	F	AS	45.9	0	0	24 33 24	62 58 62	3 3 3	4 3 4	53 52 53	3 3 3
D Z 7	16	M	AS	1262.8	4	4	24	7	7	1	52	1
	16	M	AD	116.4	0	0	11 24 11	51 7 51	7	5 1 5	52	3 1 3
D Z 8	5	F	AS•AD	43.1	0	0	11	56	1	5		3
	5	F	AS•AD	521.0	4	4	33 31 33	44 61 44		7 9 7	52 53 52	7 1 7
D Z 9	9	M	AS•AR•AC	141.8	4	3	24	54	1	2		1
	9	F	AS•AR•AD	2219.7	4	4	33 24 33	44 54 44	1 1 1	2 2 2		1
D Z 10	4	M	AD	112.6	0	0	24	52		2		
	4	M	AD	37.6	0	0	2 26 2	60 61 60	7 3 7	9 6 9	53 53	
D Z 11	16	M	AS	992.9	3	3	26	54	1	9	53	3
	16	F	AR	508.6	4	4	26 26 26	61 54 61	1	9	52 53 52	3
D Z 12	5	M	AD	1351.9	4	4	11	67	7	2	53	1
	5	F	NA	58.6	0	0	31 24 24	48 52 7	9 7	1		1
D Z 13	12	F	AS•AD	1306.4	4	4	24	44	4	9	52	1
	12	F	AC•AR AS•AD	1347.6	4	4	33 24 33	60 52 44		2	53 52	1
D Z 14	2	M	AS•AD	885.0	4	4	2	62		2	53	3
	2	M	AS•AD	1445.7	4	4	26 2 33	46 62 55	7 7	2 4	53 53	7 3 1

MZ: monozygotic twins. DZ: dizygotic twins, M: male. F: female. AS: asthma. AD: atopic dermatitis. AR: allergic rhinitis. AC: allergic conjunctivitis. NA: non-allergic.

Table 2 Concordance rate of allergic disease and DF-specific IgE in allergic twins

	Monozygotic twins	Dizygotic twins			
		Total	Concordance of HLA haplotype		
			Two	One	None
Allergic disease	7/8(88%)	12/14(86%)	8/8(100%)	4/4(100%)	0/2(0%)
Asthma	3/4(75%)	8/11(73%)	5/8(63%)	3/3(100%)	0/0
Atopic dermatitis	3/6(50%)	5/9 (56%)	1/3(33%)	4/4(100%)	0/2(0%)
Positive rate of DF-specific IgE	3/5(60%)	7/12(58%)	5/7(71%)	2/3(67%)	0/2(0%)
Negative rate of DF-specific IgE	3/5(60%)	2/7 (29%)	1/3(33%)	1/2(50%)	0/2(0%)

"Allergic disease" includes asthma, atopic dermatitis, allergic rhinitis and allergic conjunctivitis.

Table 3 Correlation of serum IgE levels in allergic twins

	Monozygotic twins	Dizygotic twins			
		Total	Concordance of HLA haplotype		
			Two	One	None
Number	8	14	8	4	2
Variance within twins	0.211*	0.495	0.439	0.181	—
Variance between twins	0.825**	0.561	0.632	0.843	—
Correlation coefficient within twins(r)	0.593	0.063	0.180	0.647	—
Heritability(h ²)	59%	3%	9%	32%	—

* : F=2.35 (no significance) ** : F=1.47 (no significance)

(75%), DZ では11組中 8 組(73%)であった。アトピー性皮膚炎は MZ が 6 組中 3 組 (50%), DZ が 9 組中 5 組 (56%) でともに一致率は低かった。

3) 特異抗体の一致率: DF 特異 IgE 抗体は RAST score 2以上を陽性としたところ陽性の一致率は MZ で 5 組中 3 組 (60%), DZ では12組中 7 組 (58%) であった。また DF 特異 IgE 抗体の陰性一致率は MZ で 5 組中 3 組, DZ では 7 組中 2 組であった。DZ のうち HLA haplotype のまったく一致していない 2 組では、いずれの場合も一致していなかった。

血清総 IgE 抗体は組内分散 (variance within twins), 組間分散 (variance between twins), 組内相関係数 (correlation coefficient within twins) を次の方法で求めて比較した²⁾。

$$\text{組内分散} = \frac{\sum(A-B)^2}{2N}$$

$$\text{組間分散} = \frac{1}{N} \left(\frac{\sum(A+B)^2}{2} - \frac{(\sum(A+B))^2}{2N} \right)$$

$$\text{組内相関係数} = \frac{\text{組間分散} - \text{組内分散}}{\text{組間分散} + \text{組内分散}}$$

組内分散は MZ が 0.211, DZ は 0.495 であり, F 値 (DZ/MZ) は 2.35 であった。組間分散では MZ が 0.825, DZ が 0.561 であり, F 値 (MZ/DZ) は 0.463 となりどちらも統計的に有意ではないが, DZ の組内分散は MZ の組内分散よりも 2 倍以上であった。

組内相関係数は MZ が 0.593, DZ が 0.063 と MZ で高い相関を示した。

考 案

双生児研究法は人類の複雑な遺伝を解析する一つの

有力な方法である¹⁾²⁾。一卵性双生児は一つの接合体の分割によって生じるため特殊な場合を除いてまったく同一の遺伝子型を持っており、一方二卵性双生児は独立に排卵された 2 個の卵子がそれぞれ受精するので遺伝学的には普通の同胞と等しいことになる。したがって、MZ と DZ の表現型を比較することで遺伝的要因と環境的要因の分析を行うことができ、さらに MZ の表現型に差をもたらした特異的環境要因の分析が行える。

双生児の収集において一般的には同一疾患に罹患した双生児が注目されてしまうが、理想的な方法は、あらかじめ双生児の標本を登録しその標本について調査を行う方法である。今回調査した双生児は一方あるいは両方がなんらかのアレルギー疾患を主訴にアレルギー科外来を受診し、問診の家族歴調査の段階で登録された患者を対象としているので疾患の一致率に偏りは生じにくくなっているものと考えられる。

MZ と DZ の卵性診断は類似診断法により双生児が MZ である確率を求めた。現在最も正確に判定する方法として「DNA フィンガープリント法」と呼ばれるミニサテライト遺伝子をマーカーとした方法が開発されているが、今回は遺伝形質として赤血球血液型 8 種類と HLA タイピングを双生児および同胞と両親で行うことより MZ である充分高い確率をえることができた³⁾⁻⁶⁾。

アレルギー疾患の一致率は喘息, アトピー性皮膚炎, アレルギー性鼻炎, アレルギー性結膜炎を含んだアレルギー疾患全体では MZ と DZ で差はなかったが、それぞれ 88%, 86% と高い一致率であった。双生児例でのアレルギー疾患の一致率のこれまでの報告では、Edfors-Lubs らの 7000 例の双生児の検討では喘息, 枯草熱, 湿疹のいずれかを含んだアレルギー疾患として

の一致率はMZでは25.3%, DZでは16.2%でMZで有意に高い一致率を示した⁷⁾。また Hopp らの107例の検討ではMZでは71%, DZでは47%の一致率であったが有意な差はなかった⁸⁾。我々の症例ではMZとDZともに疾患一致率が高かったことは対象年齢が2歳から16歳までと今までの報告に比べ年齢が低かったことが理由の一つと考えられる。一般的にアレルギー疾患の発症に環境因子の関与がいわれることから、年齢が高ずるに従い一致率の差が大きくなるとも考えられる⁹⁾⁻¹³⁾。

疾患別でもMZとDZで差はなかったが、我々の症例で2例ではあるがHLA haplotypeのまったく一致していないDZ例でどの疾患も一致していなかった。アレルギー疾患発症に主遺伝子効果を示す疾患感受性遺伝子がHLAに連鎖することはこれまでに多くの報告があり、今後も症例数を増やしていくと、こういった症例の数が増えることが考えられる。

DF特異IgE抗体の陽性例の一致率もMZで60%, DZで58%とアレルギー疾患と同様の傾向を示し、HLA haplotypeの全く一致していないDZ例では陽性例、陰性例ともに一致していなかった。抗原に対する免疫応答遺伝子、免疫抑制遺伝子の存在が、スギ花粉抗原、溶連菌細胞壁抗原、カモガヤ花粉抗原などにおいてHLAと連鎖することが報告されており、ダニ抗原においてもその可能性を示唆する結果であった。

量的形質である血清総IgE抗体の比較をするのに組内分散、組間分散、組内相関係数、遺伝率をみると、MZでは双生児内でのばらつきが少なく、遺伝的要因の強いことが示唆されたが、DZではHLA haplotypeの一致数とIgE抗体のばらつきの程度には相関はなかった。このことから、これまでMZにおいては血清総IgE抗体は高い相関を示し、さらに成人より小児において相関が高く環境要因が強く影響しているという報告や、高IgE抗体産生能は劣性遺伝して、低IgE抗体産生能は優性遺伝するという報告があるが、我々の症例の検討からその遺伝子はHLAに連鎖しないものと示唆された¹⁴⁾⁻¹⁶⁾。

稿を終るにあたり本研究の御指導、御校閲を頂いた東京慈恵会医科大学小児科学教室、前川喜平教授に深謝致します。さらに本研究に御協力頂いた、慈恵医大小児科勝沼俊雄先生、海老澤元宏先生、元国立小児病院二宮分院植草忠先生に感謝致します。本研究の一部は文部省科研費No.

61480485による。

文 献

- 1) 井上英二：ふた児の研究法とその応用。“遺伝学と医学”(村上英二編)、共立出版、東京、p.188-221, 1980.
- 2) Emery, A.E.H.: ふた児研究。“遺伝医学の統計的方法”(ed. by Emery, A.E.H., 安田徳一 訳)、共立出版、東京、pp.76-89, 1986.
- 3) 本間正充、浅香昭雄：DNA フィンガープリント法による双生児の卵性診断。日本臨床 47, 835-840, 1989.
- 4) 高橋完明：双生児の卵性診断へのアプローチ。新潟医誌 103, 447-451, 1989.
- 5) Jefferys, A.J., Wilson, V. and Thein, S.L.: Hypervariable ‘minisatellite’ regions in human DNA. *Nature* 314, 67-73, 1985.
- 6) Jeffrey, A.J., Brookfield, J.F.Y. and Semeonoff, R.: Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature* 317, 818-819, 1985.
- 7) Lubs, E. and Louise, M.: Allergy in 7000 twin pairs. *Acta Allergologica* 26, 249-285, 1971.
- 8) Hopp, R.J., Bewtra, A.K., Watt, G.D., Nair, N. M. and Townley, R.G.: Genetic analysis of allergic disease in twins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 73, 265-270, 1984.
- 9) Redline, S., Tishler, P.V., Lewitter, F.I., Tager, I.B., Munoz, A. and Speizer, F.E.: Assessment of genetic and nongenetic influences on pulmonary function. A twin study. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135, 217-222, 1987.
- 10) Svartengren, M., Ericsson, C.H., Mossberg, B. and Camner, P.: Bronchial reactivity and atopy in asthma discordant monozygotic twins. *Ann Allergy* 64, 124-128, 1990.
- 11) Svartengen, M., Ericsson, C.H., Philison, K., Mossberg, B. and Camner, P.: Tracheobronchial clearance in asthma-discordant monozygotic twins. *Respiration* 56, 70-79, 1989.
- 12) Falliers, C.J., de A. Cardoso, R.R., Bane, H.N., Coffey, R. and Middleton, E.: Discordant allergic manifestations in monozygotic twins: Genetic identity versus clinical, physiologic, and biochemical differences. *J. Allergy* 47, 207-219, 1971.
- 13) Starke, I.D.: Asthma and allergic aspergillosis in monozygotic twins. *Br. J. Dis. Chest* 79, 295-300, 1985.
- 14) Bazaral, M., Orgel, H.A. and Hamburger, R.:

- N.: Genetics of IgE and allergy: Serum IgE levels in twins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 54, 288-304, 1974.
- 15) Sistonen, P., Johnsson, V., Koskenvuo, M. and Aho, K.: Serum IgE levels in twins. *Hum. Hered.* 30, 155-158, 1980.
- 16) Wuthrich, B., Baumann, E., Fries, R.A. and Schnyder, U.W.: Total and specific IgE (RAST) in atopic twins. *Clin. Allergy* 11, 147-154, 1981.

INVESTIGATION OF THE GENETICS IN ALLERGIC CHILDREN: THE FIRST REPORT —Twin Study on HLA in Allergic Disease—

Akira Akasawa

Department of Pediatrics, Jikei Medical University

Niroku Koya

Department of Pediatrics, Toho University

Yoji Iikura

Department of Allergy and Immunology, National Children's Medical Research Center

Twenty-two twins' families were investigated to determine the influence of a genetic factor in the etiology of allergic diseases in children. Zygosity was confirmed by eight red cell blood types and HLA type. Eight pairs of monozygotic twins were divided by a probability of monozygosity as calculated from Essen-Möller's method. Concordance rate of allergic disease and asthma were 88% in MZ, 86% in DZ, 75%, 73% and that of positive rate of DF-specific IgE antibody were 60% in MZ, 58% in DZ. In DZ, not sharing the same HLA haplotypes, concordance of the positive rate of DF-specific IgE antibody was 0%. Concomitant coefficient of total serum IgE levels were 0.593 in MZ, 0.063 in DZ. These data suggested that IgE production may be influenced by genetic factors.